第29卷 第2期 昆 虫 学 报 Vol. 29, No. 2
1986 年 5 月 ACTA ENTOMOLOGICA SINICA May. 1986

苏云金杆菌以色列变种的晶体及其对蚊幼虫中肠蛋白酶活性的影响*

仇 序 佳 雷 群 邦
(中山大学昆虫学研究所) (中山大学生物学系)

摘要 用国产泛影葡胺介质对苏云金杆菌以色列变种的晶体和芽孢混合物进行密度梯度离心分离，可分别获得纯度98%的晶体和芽孢。经过对致乏库蚊3龄幼虫的毒性测定，结果表明毒杀蚊幼虫主要是晶体，芽孢也有些作用。电镜观察结果表明晶体有球形、卵形、五角形、菱形、长方形、长圆形等多种形态。致乏库蚊和骚扰阿蚊(第2天)取食苏云金杆菌以色列变种菌粉后经过不同时间测定，中肠的胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶的活性降低。

关键词 苏云金杆菌以色列变种 蚊幼虫 胰蛋白酶 胰凝乳蛋白酶

苏云金杆菌以色列变种 *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (简称 *B. t. i.*) 对多种蚊幼虫的毒杀效果很好。其毒杀作用主要是晶体(徐启丰，1980；王瑛等，1981；Barjac，1978；Tyrell 等，1979)。关于 *B. t. i.* 的晶体单一形态也有过报道(仇序新等，1983；沙槎云等，1982)。但其形态的多样性及对蚊幼虫中肠的胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶活性的影响却未见有报道。本文就这方面的试验结果报道如下，为 *B. t. i.* 毒杀蚊幼提供理论依据。

材 料 与 方 法

1. 晶体与芽孢混合物的制备 以法国巴斯德研究所的 *B. t. i* 标准菌粉(上海昆虫研究所1983年提供)分离菌株并接种在固体培养基(牛肉膏0.3%，蛋白胨1%，葡萄糖0.3%，NaCl 0.2%，KH_2PO_4 0.1%，洋菜2%，蒸馏水100毫升，pH7.2)上，于28—30℃培养4—10天，加入含0.01% Triton 的 1*M* NaCl 溶液洗下培养物，用磁力搅拌器分散培养物，然后抽滤，滤液在离心机10,000转/分(4℃)离心10分钟，弃去上清液，得到晶体和孢子混合物放4℃冰箱贮存。

2. 密度梯度离心与晶体芽孢的收集 参考 Milne 等(1977)和王瑛等(1980)的方法，除了用国产泛影葡胺50%和80%浓度作直线梯度混合原液，以日立密度梯度分部器 DGF-U 型在5毫升离心管铺成直线梯度溶液，然后加入含0.01% Triton 的 1*M* NaCl 溶液的晶体和孢子混合物0.2毫升(相当于湿重20毫克)，在日立55 p-2型离心机的水平转子28,000×g，4℃离心30分钟以外；其它步骤与上述作者相同。

3. 纯度鉴定 将上述晶体和芽孢以一定量重蒸馏水稀释后用日立 HU-12A 电镜镜检计数。

本文于1984年6月收到。
* 本工作获得中国科学院科学基金的资助。生物系电镜室、本所胡美传同志拍照洗印照片，在此表示感谢。

4. 生物测定　用密度梯度分离的晶体和芽孢分别以 1 微克/每毫升的浓度配成 100 毫升溶液饲喂致乏库蚊 3 龄幼虫，每 24 小时检查死虫数。

5. 蚊幼虫中肠的胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶的活性测定

蚊幼虫　致乏库蚊 *Culex pipiens fatigans* 和骚扰阿蚊 *Armigeres subalbatus* 4 龄幼虫(第 2 天)每次各 30 头放入含有 400 毫升菌液(97×10^2孢子/毫升，用本所实验室的 *B. t. i.* 菌粉稀释)，置 28℃ 恒温箱，经幼虫取食 10 分钟，1 小时、4 小时和 8 小时后取出，冰冻麻醉解剖中肠，作测定两种蛋白酶活性的样品，测定虫数分别为 18—20 头。

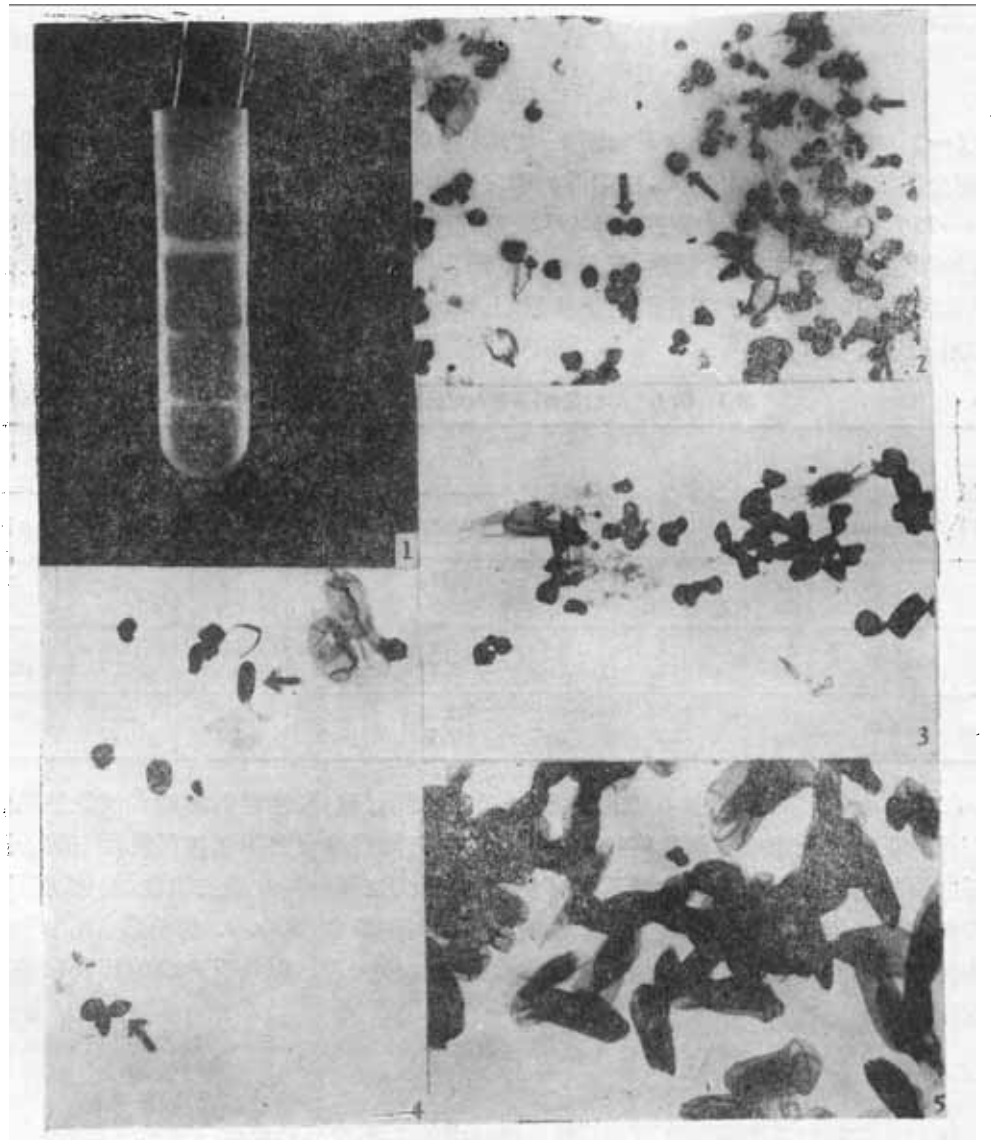

图 1　*B. t. i.* 的密度梯度离心结果

1. 上部，营养体碎片；中部，晶体；下部，芽孢 2—4. 晶体的各种形态（电镜照片，除 2 为 2500×外，其余均为 5000×）

箭头指示：2. 正中圆形、五角形、右上方卵形 3. 长方形 4. 左下方菱形、上方为长圆形 5. 芽孢 5000×

胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶的活性测定 前者参考 Yang 和 Davies(1968) 的方法，后者参考 Yang 和 Davies(1971)的方法。均以每头幼虫的中肠经匀浆、离心后的 50 微升上清液作酶溶液。胰蛋白酶的特异性底物用对甲苯磺酰-L-精氨酸甲酯盐酸盐 (p-tosyl-L-arginine methyl ester HCl，简称 TAME，Sigma 公司进口)。胰凝乳蛋白酶的特异性底物用 N-戊二酰-L-苯丙氨酸对硝基酰替苯胺 (N-glutaryl-L-phenylalanine p-nitroanilide，简称 GPNA，Sigma 公司进口)。胰蛋白酶溶液(呈紫蓝色)用上海 721 型分光光度计在 580 毫微米波长下测量光密度值，胰凝乳蛋白酶溶液 (呈黄色) 在 410 毫微米波长下测量光密度值。

结 果

(一) 密度梯度离心 结果如图 1：1，可看到三条带，上面为营养体碎片，中间为晶体，在介质浓度 60—65% 之间，平均浮力密度为 1.415 4 克/厘米^3；下面为芽孢，在介质浓度70—75% 之间，平均浮力密度为 1.4952 克/厘米^3。晶体和芽孢分离的纯度可达到 98%。晶体的形态多样，有球形、卵形、五角形、菱形、长方形、长圆形等 (图 1:2-4)。用分离的晶体和芽孢对蚊幼虫的毒性测定结果表明，晶体是毒杀蚊幼虫的主要成分，但芽孢也有些作用 (表 1，图 1:5)。

表 1 *B. t. i.* 的晶体、芽孢对致乏库蚊 3 龄幼虫的毒力

组 别	试验次数	浓度 (微克/毫升)	试验虫数	幼虫死亡率(%)				
				24 小时	48 小时	72 小时	96 小时	合计
晶 体	第 1 次	1.0	60	76.7	23.3	—	—	100.0
	第 2 次	1.0	60	100.0	—	—	—	100.0
芽 孢	第 1 次	1.0	60	0.0	0.0	6.7	15.0	21.7
	第 2 次	1.0	60	3.3	3.3	1.7	1.7	10.0
对 照	第 1 次	0.0	60	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	第 2 次	0.0	60	0.0	0.0	0.0	1.7	1.7

(二) *B. t. i.* 对蚊幼虫中肠的胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶活性的影响 试验结果由图 2 表明，正常致乏库蚊和骚扰阿蚊幼虫中肠的蛋白酶有胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶。这两种蛋白酶的活性变化在 1 天内看不到有规律的变化，这可能与蚊幼虫取食、消化、吸收、排泄等多种因素影响有关。上述两种蚊幼虫经不同时间取食 *B. t. i.* 菌粉后，其中肠内上述两种蛋白酶的活性均比正常低。就两种蚊幼虫比较来说，以致乏库蚊的胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶的活性受影响较大。

讨 论

我们的试验结果表明，*B. t. i.* 毒杀蚊幼虫的主要成分是晶体，其晶体有多种形态。Tyrell 等 (1981) 曾提到在 *B. t. i.* 形成孢子时，产生有立方形、双棱锥形、六角形、球形、卵形或不定形 2—3 个晶体。每种晶体是否都有毒性？哪种晶体的毒性最大？这是值得深入研究的。我们从分离 *B. t. i.* 的孢子经过对致乏库蚊 3 龄幼虫的测定发现有些毒

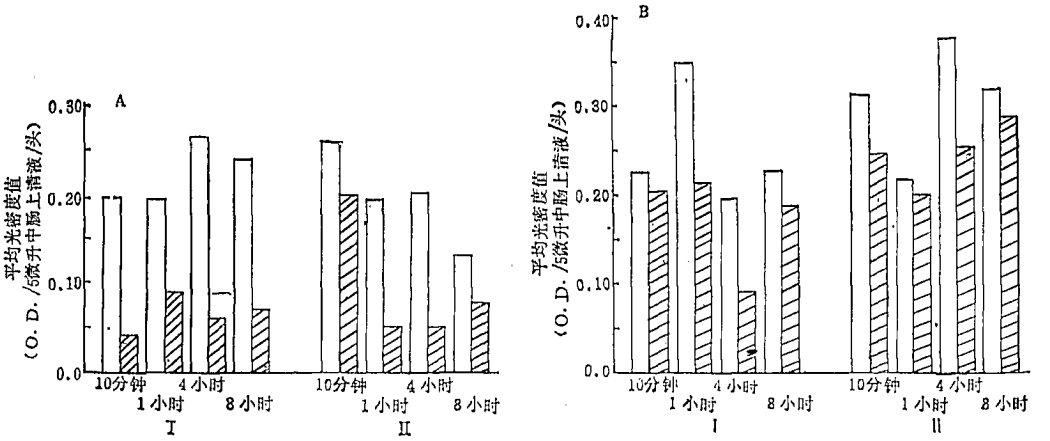

图 2　*B. t. i.* 对 4 龄蚊幼虫（第 2 天）中肠两种蛋白酶活性的影响

A. 致乏库蚊 *Culex pipiens fatigans*　B. 骚扰阿蚊 *Armigeres subalbatus*　I. 胰蛋白酶相对活性（580 毫微米波长测量）　II. 胰凝乳蛋白酶相对活性（410 毫微米波长测量）

□ 正常　▨ 处理

性，与王瑛等（1981）报道芽孢对尖音库蚊 3 龄幼虫具有毒性的结果一致，这对今后进一步开展 *B. t. i.* 毒杀蚊幼虫的作用及应用研究是有帮助的。*B. t. i.* 的晶体对蚊幼虫的毒杀作用，除了 Barjac（1978）报道了埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 幼虫病变的组织学观察以外，目前资料不多。我们的试验结果表明致乏库蚊和骚扰阿蚊 4 龄幼虫取食 *B. t. i.* 菌粉后，中肠的胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶的活性均受影响。Yang 和 Davies（1971）曾报道埃及伊蚊幼虫期中肠的胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶的活性很高，主要是消化蛋白质食料作为幼虫营养吸收，生长发育需要的缘故。因此，*B. t. i.* 影响这两种蛋白酶的活性下降，是导致致乏库蚊和骚扰阿蚊幼虫死亡的原因之一。

参　考　文　献

王　瑛等　1981　苏云金杆菌以色列变种对尖音库蚊的毒杀作用。昆虫学报 **24**(1)：42—7。

王　瑛等　1980　苏云金杆菌晶体与芽孢分离的研究。微生物学报 **20**(3)：285—8。

任改新等　1983　苏云金杆菌伴孢晶体的形态及抗原特性。微生物学报 **23**(1)：57—62。

沙槎云、白成　1982　昆虫肠道蛋白酶对苏云金杆菌晶体作用的比较。昆虫学报 **25**(3)：244—9。

徐启丰等　1980　苏云金杆菌以色列变种灭蚊的有效成分。微生物学通报 **7**(5)：199—200。

Barjac, H. de 1978b Toxicite de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* pour les larves d'*Aedes aegypti* et d' *Anopheles stephensi*. C. R. Acad. Sci. Paris, Ser. D. 286: 1175—8.

Barjac, H. de 1978c Etude cytologique de l'action de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sur larues de moustiques. C. R. Acad. Sci. Paris Ser. D. 286: 1629—32.

Milne, R. et al. 1977 *Bacillus thuringiensis* δ-endotoxin: An improved technique for the separation of crystals from spores. *J. Inverteb. Pathol* 29(2): 230—1.

Tyrell, D. J. et al. 1979 Toxicity of parasporal crystals of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelenisis* to mosquito. *Appl. Environ Microbiol* 38(4): 656—8.

Tyrell, D. J. et al. 1981 Comparative biochemistry of entomocidal paraspora. crystals of selected *Bacillus thuringiensis strain*. *J. Bacteriol.* 145(2): 1052—62.

Yang, Y. J. and Davies, D. M. 1968 Digestion emphasizing trypsin activity in adult simuliids (Diptera) fed blood, blood-sucrose mixtures and sucrose. *J. Insect Physiol.* 14: 205—22.

Yang, Y. J. and Davies, D. 1971 Trypsin and chymotrypsin during metamorphosis in *Aedes aegypti* and properties of the chymotrypsin. *J. Insect Physiol.* 17(1): 117—31.

THE CRYSTALS OF *BACILLUS THURINQIENSIS* VAR. *ISRAELENSIS* AND THEIR EFFECT ON THE MIDGUT TRYPSIN AND CHYMOTRYPSIN ACTIVITIES OF MOSQUITO LARVAE

QIU XU-JIA

(Institute of Entomology of Zhongshan University)

LEI QUN-BANG

(Department of Biology of Zhongshan University)

Crystals and spores from the strain *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*B. t. i.*) were purified by centrifugation of the prepared mixture in a urografin density gradient. They have reached purities of 98% respectively. Electromicroscopical examination revealed that the crystals varied in size and shape and consisted spherical, ovoid, pentagonic, diamond, rectangular and amorphic components. Results of bioassay on the third instar larvae of *Culex pipiens fatigans* with purified crystal and spore preparations indicated that the crystals played a major role of killing the larvae while the spores also possessed certain larvicidal activity. The larval midguts of *C. p. fatigans* and *Armigeres subalbatus* showed trypsin and chymotrypsin activities which declined progressively after treating the larvae on the second day of fourth instar with the bacterial suspension. The results suggested that the larvicidal effect of *B. t. i.* manifested partially in the inhibition of midgut trypsin and chymotrypsin activities of the mosquito larvae.

Key words *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*——mosquito lavra——trypsin ——chymotrypsin